

# CHO 细胞工程化改造的研究进展

宓庆宇 游敏 罗文新\*

(厦门大学分子疫苗学和分子诊断学国家重点实验室 厦门大学公共卫生学院 福建 厦门 361102)

**摘要:** 该文综述了 CHO 细胞工程化改造相关研究的最新进展,对 CHO 细胞在调节代谢、抗凋亡和糖基化等方面的工程改造及应用进行了归纳和总结,提出了 CHO 表达系统应用中可能出现的问题,并对 CHO 细胞表达系统应用前景进行了展望,以为后续相关研究提供思路。

**关键词:** 重组蛋白类药物; 宿主细胞; 抗凋亡; 工程改造

中图分类号: Q813 文献标识码: A DOI: 10.16519/j.cnki.1004-311x.2019.03.0052

## CHO cell engineering progress

MI Qing - yu ,YOU Min ,LUO Wen - xin \*

(State Key Laboratory of Molecular Vaccinology and Molecular Diagnostics School of Public Health ,Xiamen University ,Xiamen 361102 ,China)

**Abstract:** In this paper the latest research progress of summarizes the CHO cells engineering progress was reviewed ,we mainly discussed and summarized the CHO cells in regulating metabolism ,antiapoptotic and glycosylation engineering and application ,proposed the CHO expression system applications ,the potential problems and prospect of CHO cell expression system application was discussed ,which was expected to provides ideas for subsequent research.

**Keywords:** recombinant protein drugs; Host cells; antiapoptotic; engineering

重组蛋白类药物因其极强的靶向特异性运用于多种疾病的诊断与治疗<sup>[1]</sup>。在其生产的过程中,宿主细胞只有对蛋白进行正确的折叠和翻译后修饰才能保证其活性,所以目前大部分已上市的生物药由哺乳动物细胞生产。哺乳动物细胞表达系统的主要宿主有中华仓鼠卵巢细胞(CHO)、幼仓鼠胚肾细胞(BHK)、杂交瘤细胞(Hybridoma)、非洲绿猴肾细胞(Vero)以及人胚肾细胞(HEK 293)等。其中,CHO 细胞易于悬浮驯化,可支持大规模生产放大,可以实现无血清及动物源培养,降低了被动物病毒污染的风险<sup>[2]</sup>,是抗体生产的最优选宿主<sup>[3-4]</sup>。研究者针对 CHO 细胞进行了一系列工程化改造以促进产量与质量的提高。当前,对 CHO 细胞进行工程化改造主要通过这三类技术:基因编辑、基因干扰和细胞培养工艺改造技术(图 1)。

## 1 CHO 细胞工程化改造采用技术

### 1.1 基因编辑技术

基因编辑技术可以实现对基因组靶点的定点改

造,完成特定 DNA 插入、敲除、突变,最终达到上调、下调或使目的基因表达沉默的效果。目前,主流的基因编辑技术有以下三种:锌指核酸酶技术<sup>[5]</sup>(zinc - finger nucleases ,ZFNs)、转录激活样效应因子核酸酶技术(transcription activator - like effectors nucleases ,TALENs)以及成簇的规律间隔的短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats ,CRISPR) CRISPR/相关蛋白(CRISPR associated proteins ,Cas)系统<sup>[6]</sup>。作为基因编辑的主要手段,CRISPR/Cas9 技术在 CHO 细胞的改造方面有许多应用,主要围绕改善细胞生长以及提高产能进行细胞工程改造<sup>[7]</sup>。相比于传统的物理、化学方法产生的基因突变,这三种技术对于目的基因的改造更加精准、高效、快捷<sup>[8]</sup>。

### 1.2 RNA 干扰技术

RNA 干扰技术(RNA interference ,RNAi)可以使特定的 mRNA 发生降解,从而导致基因表达沉默或上调现象,分为 siRNA(small interference RNA)途径和 miRNA(micro RNA)途径,二者均可能导致靶标

收稿日期:2019 - 03 - 06

基金项目:福建省自然科学基金项目(2017J01066);国家自然科学基金项目(31670927;31870925);传染病重大专项(2017ZX10202203 - 001 - 001)

作者简介:宓庆宇(1991 - )男,山东聊城人,硕士生,研究方向:细胞株构建,E - mail:1421919781@qq.com。

\* 通讯作者:罗文新(1970 - )女,湖南湘潭人,博士,副教授,研究方向:抗体工程,发表 SCI 论文 24 篇,E - mail:wluo@xmu.edu.cn。

基因的降解,而 miRNA 可提高 CHO 细胞产生重组蛋白质效率<sup>[9]</sup>。RNA 干扰技术广泛用于特异性基因沉默,旨在改善细胞抗凋亡,调节细胞代谢及提高

细胞产能,在国内较少有利用此策略改造 CHO 细胞的相关报道。

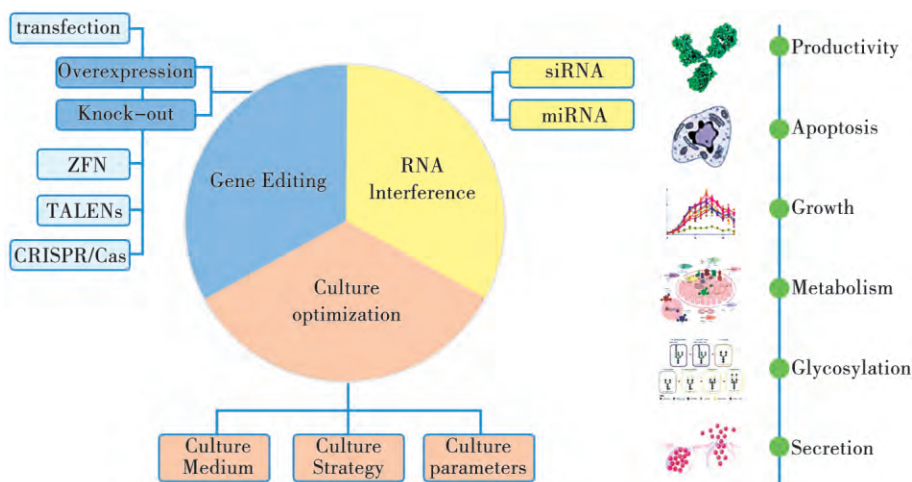


图1 CHO 细胞工程化改造

Fig.1 Engineering in CHO cells

### 1.3 细胞培养工艺优化

细胞培养工艺对抗体的产量和质量有十分重要的影响,培养工艺优化涉及多个方面,如基础培养基、补料策略和理化参数控制等。对这些参数进行组合优化,可以改善细胞生长、延长培养周期,最终实现产能提升。

以上改造对于缩短生物类药物研发周期、降低生产成本及提高药效具有非常重要的意义。近年来有许多关于 CHO 细胞工程化改造研究,根据不同的细胞工程改造目的进行实验(图1)。

## 2 细胞工程改造在 CHO 中应用

基因编辑技术及基因干扰等技术在 CHO 细胞株构建中的应用十分普遍,通过这些技术对细胞进行改造,赋予了细胞良好的生长特性及表达水平。细胞工程改造涉及多个方面,在抗凋亡、调节代谢和糖基化等方面的改造应用最为广泛<sup>[10-12]</sup>。

### 2.1 CHO 细胞抗凋亡改造

细胞培养过程中会面临营养物耗竭、代谢废物积累、渗透压增高等外部环境刺激以及细胞程序性死亡(Programmed cell death, PCD)的调控,这将对活细胞密度及产物的数量及质量造成一定影响<sup>[13]</sup>。前期研究已发现,对于 PCD 进行调控干预是克服上述问题的关键,而且通过建立抗凋亡的 rCHO 细胞来延缓细胞凋亡具有一定成效<sup>[14-15]</sup>,图2展示了

CHO 细胞抗凋亡的基因工程策略<sup>[10,16-17]</sup>。

#### 2.1.1 过表达抗凋亡相关基因

细胞凋亡过程受 Bcl-2 家族蛋白成员的调控:抗凋亡 Bcl-2 样蛋白,促凋亡的 Bax 样蛋白以及促凋亡的 BH3 蛋白<sup>[18-19]</sup>。抗凋亡蛋白的激活和促凋亡因子的抑制的改造对于延迟细胞凋亡的发生特别有意义。将抗凋亡基因 Bcl-xL 与 Mcl-1 在 CHO 细胞内共转染可增强细胞存活和抗体产生<sup>[14]</sup>。除了抗凋亡基因,过表达 *Aven*、*Faim*、*XIAP* 和 *Crma* 等基因也延长了细胞培养的生命<sup>[16]</sup>。通过在 CHO 细胞中过表达 X-box 结合蛋白(XBP-1(s)) 增强了细胞抗凋亡能力,使 IgG 的表达量显著提高<sup>[20]</sup>。此外,将人造锌指蛋白转录因子在 CHO 中过表达,使 IgG 滴度增加 10 倍<sup>[21]</sup>。

#### 2.1.2 下调促凋亡基因

通过 siRNA 下调促凋亡基因(如 Caspase),使用 ZFNs 或 CRISPR/Cas9 系统敲除 *Bax* 和 *Bak* 基因,也可提高细胞凋亡抗性<sup>[22-25]</sup>。有研究显示,通过敲除细胞中 BAX(Bcl-2 相关蛋白 X) 及 BAK,表达抗体的产量为改造前的 6 倍<sup>[26]</sup>。研究者通过构建出 8 号染色体端粒区缺失的缺陷型细胞,改善了细胞生长与表达,产量大幅提高<sup>[27]</sup>。

#### 2.1.3 其他抗凋亡相关改造

通过阶段性补料,或使用替代碳源(如半乳糖代替葡萄糖或使用腺苷)等策略也可实现细胞抗凋

亡<sup>[28]</sup>。外泌体是由 CHO 细胞产生的纳米级细胞外囊泡,研究者将其当补充到培养基中时,发现其可以抑制 CHO 细胞培养物中的细胞凋亡<sup>[17]</sup>。将人雷帕

霉素的哺乳动物靶标 (mTOR) 在 CHO 中进行异位表达,能够提高细胞活率、细胞凋亡抗性和糖蛋白的比生产率<sup>[29]</sup>。

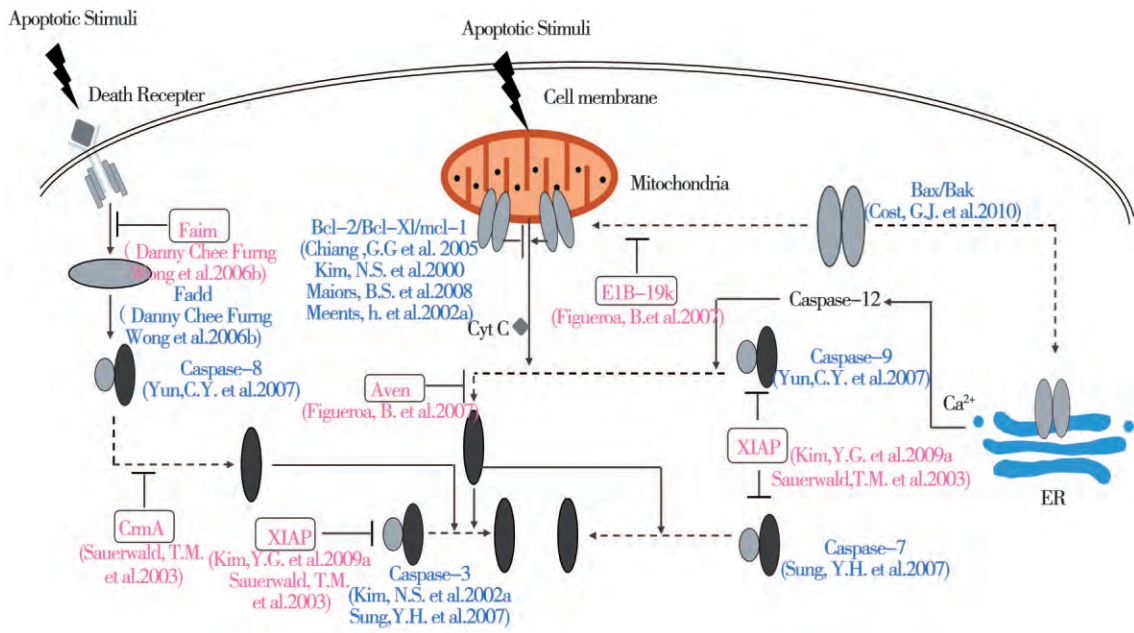


图2 CHO 细胞抗凋亡相关改造<sup>[18-34]</sup>

Fig.2 Antiapoptosis engineering of CHO cells<sup>[18-34]</sup>

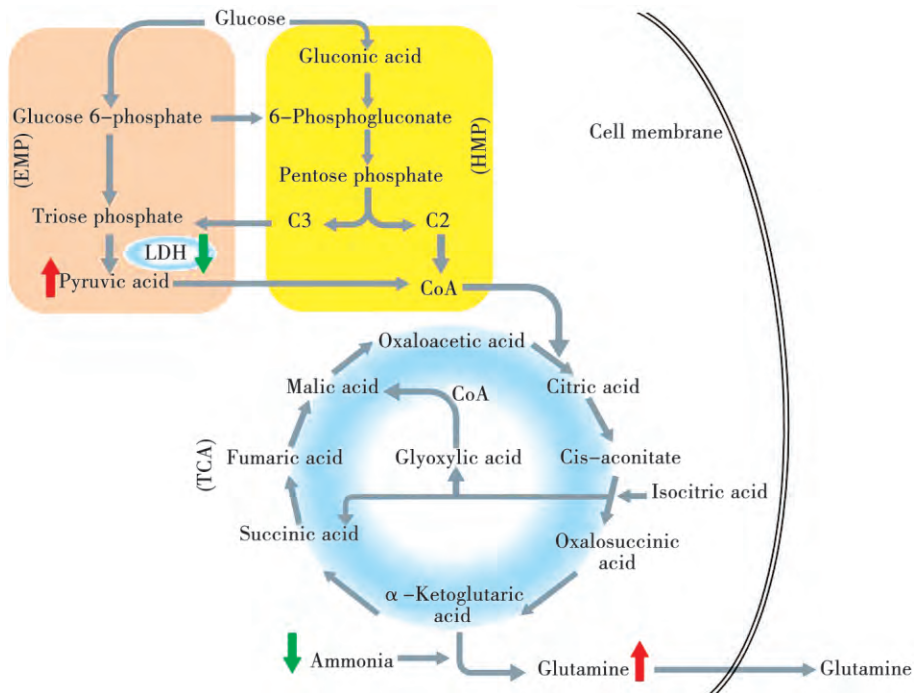


图3 CHO 细胞代谢相关改造

Fig.3 Metabolic engineering of CHO cells

以上的改造大部分处于研究阶段,暂未运用于产业化蛋白的大规模生产。由于过表达抗凋亡基因

改造能使细胞产生较好的抗凋亡效果,未来可能被广泛应用。

## 2.2 CHO 细胞调节代谢工程改造

在 CHO 细胞生长过程中,代谢废物的产生不可避免。由于培养基中存在谷氨酰胺(Glutamine, Gln)和葡萄糖,所以氨和乳酸是重组 CHO 细胞培养期间最常见的代谢废物,对生长的细胞和分泌的重组产物会造成不利影响<sup>[30]</sup>。因此,抑制有毒代谢副产物的积累也是 CHO 细胞改造的重点。图 3 展示了 CHO 细胞代谢调节的基因工程策略。

### 2.2.1 降低氨生成的改造

在 CHO 细胞中过表达谷氨酰胺合成酶(GS)基因,使得细胞能够在不含 Gln 的培养基中生长,从而显著减少培养物中副产物氨的产生<sup>[31]</sup>。此外,鸟氨酸转氨甲酰酶(Ornithine transaminase)或氨基甲酰磷酸合成酶 I(Carbamyl phosphate synthetase I)(与尿素循环相关的酶)过表达可降低培养基中的氨产生<sup>[32]</sup>。以上改造均延长了细胞培养的时间,有利于提高产量。

### 2.2.2 减少乳酸生成的改造

研究者在减少乳酸积累的相关试验中发现,丙酮酸羧化酶在 CHO 细胞中过表达可明显降低培养后期的乳酸积累<sup>[33]</sup>。当使用 siRNA 介导的单一靶向载体成功下调丙酮酸脱氢酶激酶以及乳酸脱氢酶 A(LDH-A)的表达,降低了培养物中的乳酸含量<sup>[34-35]</sup>。将酵母丙酮酸羧化酶(PYC2)在 CHO 细胞中过表达,提高了乳酸消耗,延长了指数生长期<sup>[36]</sup>。

## 2.3 CHO 细胞表达系统的改造

CHO 细胞表达系统的改造,不仅可以提高细胞筛选效率,还可以通过增加基因拷贝数提高表达水平,主要包括筛选标记的改造和质粒的改造两方面。

### 2.3.1 CHO 细胞筛选标记的改造

CHO 表达系统主要包括基于甲氨蝶呤(methotrexate, MTX)筛选系统的 CHO/dhfr<sup>-</sup>,以及基于蛋氨酸亚氨基代砜(methionine sulfoximine, MSX)筛选系统的 CHO K1、CHO-S<sup>[37]</sup>。ZFNs 技术作为较早应用的基因编辑技术,已成功应用于 CHO 细胞表达系统的改造。早在 1987 年,研究者发现对细胞内源 GS 基因利用 ZFNs 技术进行敲除后,使用 MSX 可提高 GS 系统的基因拷贝数<sup>[38]</sup>;除了提高基因拷贝数,运用 ZFN 技术敲除了 CHO-K1SV 细胞的内源 GS 基因,使稳定细胞株构建的效率提高 6 倍<sup>[39]</sup>。Sigma Aldrich 公司利用 ZFNs 技术,将 CHO 细胞基因组中可以作为筛选标记的两种基因分别敲除:谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS)基因和二氢

叶酸还原酶(dihydrofolate reductase, DHFR)基因,得到了 CHO/dhfr<sup>-</sup>缺陷株以及 CHO/GS<sup>-</sup>缺陷株<sup>[40]</sup>。也有研究报道,利用 RNAi 技术成功下调了细胞内 DHFR 的基因表达,使抗体的表达量提高 1 倍<sup>[41]</sup>。筛选标记缺陷型工程细胞株的商业化应用,使 CHO 细胞在生物制品研发和生产中发挥着重要作用。

### 2.3.2 CHO 细胞表达载体的改造

质粒是哺乳动物细胞表达常用载体<sup>[42]</sup>,其设计主要有两种形式:双质粒共转染或者单质粒转染。由于后者可将基因整合在同一位点,可实现便捷的比例控制,所以在稳定表达重组抗体中最为常用<sup>[43]</sup>。此外,构成质粒的元件也已经成为研究重点,如启动子、增强子、polyA 和其他顺式作用元件等<sup>[44]</sup>。研究者在利用 CHO 细胞测试不同的启动子强度时发现, CHEF-1 $\alpha$  启动子产生最高的转基因表达水平, CMV 启动子在细胞的长期培养期间维持转基因表达更稳定<sup>[45]</sup>。利用 CHO 基因组序列信息设计出合成启动子,其转录强度比 CMV-IE 启动子高 2.5 倍<sup>[46]</sup>。而运用源自 CHO 基因组的增强子 DNA 元件近端增强子(proximal enhancer, PE)使得 scFv-Fc 生产力提高了 2.6 倍<sup>[47]</sup>。此外,也有研究报道,基质附着区(Matrix attachment regions, MARs)基因在 CHO 细胞过表达可增加外源基因的表达水平<sup>[48]</sup>。

## 2.4 改善 CHO 细胞分泌的改造

在哺乳动物细胞抗体生产的相关研究中,揭示了重组蛋白在内质网中的组装和折叠是 CHO 细胞抗体合成速率最重要的限制步骤<sup>[49]</sup>,蛋白质分泌过程已被确定为重组蛋白质生产的瓶颈<sup>[50]</sup>。这些工程改造主要通过增加 CHO 细胞分泌来提高重组蛋白产率。

### 2.4.1 过表达外源基因改善分泌

通过 PD1 在 CHO 细胞中的过表达,能够提高轻链和重链的合成速率,使抗体分泌速度提高了 3 倍<sup>[51]</sup>。将人造锌指蛋白转录因子在 CHO 中过表达,使 IgG 滴度增加 10 倍<sup>[21]</sup>。对于难以表达的蛋白质,研究者将人类信号传导受体蛋白 14(SRP14)在 CHO 中过表达,促进难以表达的蛋白质的分泌<sup>[52]</sup>。此外,也有报道指出过表达 Hsp70 或 Hsp40 可促进重组蛋白的折叠与分泌<sup>[53]</sup>。

### 2.4.2 改善 CHO 细胞分泌的其他改造

研究者在促红细胞生成素(Erythropoietin, EPO)的 5' UTR 中添加 m6A 基因序列后, EPO 滴度提高了 2.84 倍<sup>[54]</sup>。培养条件的变化也可增加细胞生产

率。冷诱导 RNA 结合蛋白( cold - inducible RNA - binding protein , CIRBP) 在 CHO 细胞中过表达, 可以增加重组蛋白滴度。同时, 在低温( 30 ~ 33 °C) 下培养, 重组 CHO 细胞对于特异性重组蛋白质生产率提高了 2 ~ 5 倍<sup>[55]</sup>。科学家首次报道使用荧光蛋白融合 IgG 作为分析重组 CHO 细胞分泌的工具的研究, 为后续检测细胞分泌提供较好的方法<sup>[56]</sup>。除了对细胞进行基因编辑, RNA 干扰也常用于改善细胞生

长。研究发现, miR - 7 的消耗导致细胞密度增加 65%, 并且细胞分泌的 IgG 蛋白的产量增加 3 倍<sup>[9]</sup>。

## 2.5 提高细胞产量的工程改造

重组蛋白产量与工程细胞的活率与密度有着十分重要的联系。高细胞密度( High Cell Density , HCD) 培养是通过增加营养物质可用性以及常规培养基补充, 以更高的生物量来提高重组蛋白质的生产力, 去除了不需要的代谢组分<sup>[57]</sup>。相关改造如图 4 所示。

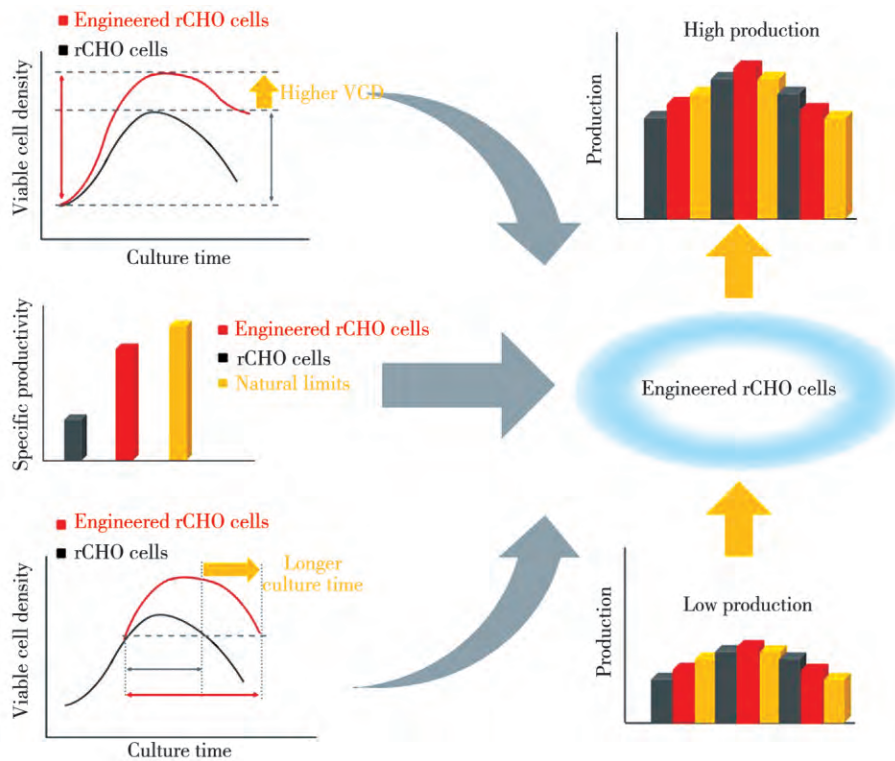


图 4 提高 CHO 产量方案示意图

Fig. 4 Cell engineering on improving production

### 2.5.1 提高细胞密度

研究者发现, 通过 miRNA - sponge - decoy 可以对内源 miR - 378 - 3p 进行稳定消耗, 使峰值细胞密度( VCD) 提高了 59%<sup>[58]</sup>。将中国仓鼠热休克蛋白 27( HSP27) 在细胞中过表达可以将 VCD 提高 2.2 倍<sup>[59]</sup>。采用外源基因过表达或基因干扰均可提高 VCD。

### 2.5.2 提高细胞生产率

选择性抑制剂化合物直接靶向 CDK4/6, 使细胞周期停滞, 提高细胞生产率( product per cell , qP)<sup>[60]</sup>。miR - 744 被为是与降低的生产力相关的潜在靶标, 等运用 CRISPR/Cas9 将 miR - 744 前体序列敲除, 能够提高细胞生产率<sup>[61]</sup>。另外有研究指出, 在 p21<sup>CIP1</sup>( CDK 抑制因子) 诱导的细胞生长抑制后, 导致细胞 G1 期停滞, 最终生产力提高

4 倍<sup>[62]</sup>。

### 2.5.3 延长细胞生长周期

对细胞周期和细胞增殖的控制基于细胞周期蛋白依赖性激酶( cdks) 的活性。研究表明, 将 Cdk1 和 Cdk2 的双敲除导致 CHO 细胞的 G1/S 细胞周期停滞, 延长了细胞生长时间<sup>[63]</sup>。将中华仓鼠热休克蛋白 27 和 70( HSP27 和 HSP70) 在 CHO 中过表达, 可延长细胞培养周期, 增加抗体产量<sup>[64]</sup>。此外, 向细胞培养基中补充表没食子儿茶素没食子酸酯( Epi-gallocatechin gallate , EGCG) 导致细胞生长减缓及细胞寿命延长, 使重组 IgG1 的比生产率和总产量提高了近 50%<sup>[65]</sup>。

## 2.6 抗体类药物糖基化工程改造

糖基化是影响生物治疗药物安全性, 有效性和稳定性的关键质量属性( CQA) 之一。通过内质网和

高尔基体中的糖基转移酶和糖苷酶的连续作用在蛋白质上发生酶促反应,达到添加寡糖的修饰效果<sup>[66]</sup>。糖基化对于抗体的影响主要表现为:抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)和补体依赖性细胞毒性(CDC)<sup>[67-68]</sup>。

### 2.6.1 岩藻糖(FUT8)基因敲除

研究显示,当去除抗体重链N-糖链的岩藻糖分子后,抗体依赖细胞介导的细胞毒作用(antibody-dependent cellular cytotoxicity,ADCC)和补体依赖性细胞毒性(CDC)效应将显著增强,抗体的药效将大幅提升。

目前已经证实,从IgG1抗体的Fc区中的聚糖中去除核心 $\alpha$ 1 $\beta$ 岩藻糖,可以提高抗体依赖性细胞毒性(ADCC),现已经成功运用于临床<sup>[69]</sup>。研究者利用CRISPR/Cas9技术,将CHO宿主细胞中FUT8基因进行敲除,在不影响细胞表达量和产物质量属性的前提下,得到了表达去岩藻糖基化单抗的细胞株<sup>[70]</sup>。类似的报道都证实,从CHO细胞中敲除FUT8,导致非岩藻糖基化抗体分子的表达,ADCC活性显著改善<sup>[71]</sup>。目前,对于FUT8敲除已成功应用于抗体药物生产,抗体药效得以大幅提升。

### 2.6.2 唾液酸化

唾液酸与重组糖蛋白的半衰期和生物活性以及免疫原性密切相关<sup>[72]</sup>。将仓鼠CMP-唾液酸转运蛋白(CMP-SAT)在细胞内过表达可以提高抗体的唾液酸化<sup>[73]</sup>。但是外源CMP-SAT与宿主细胞的唾液酸化谱需互相匹配,否则不易实现唾液酸化改造。

### 2.6.3 半乳糖化

抗体末端半乳糖基化对IgG中Fc段构象形成至关重要,它可影响IgG的CDC活性,半乳糖基化下降将削弱CDC活性。有研究显示,与不含半乳糖或葡萄糖的补料相比,培养细胞中加入含有半乳糖的补料,导致单半乳糖聚糖(G1)聚糖增加8~20%,二半乳糖聚糖(G2)聚糖增加2~6%<sup>[74]</sup>。这表明,采用基于非葡萄糖和潜在乳酸的培养策略来获得目标糖基化具有可行性。

## 3 问题与措施

对于CHO细胞的工程改造,可以分为传统改造和工程改造。传统的细胞改造涉及培养基优化、表达载体优化、培养方式优化等。传统改造方法未从宿主细胞本身的生物学特性作为改造的出发点,因此相对于细胞工程改造,其改良的效率较为低下。

基因敲除技术虽然在细胞改造方面具有一定成效,但仍面临着以下问题:其一,对CHO细胞进行基因改造时,基于CRISPR/Cas9技术的靶向效率有差异较大,同时该技术还存在的脱靶突变的可能。通过gRNAs或Cas9蛋白进行优化及再设计,对解决上述问题具有一定可行性;其二,需加强对CHO细胞凋亡以及代谢的进一步研究,同时探究转录活性位点。这将有助于快速得到生长良好、高水平表达,且产物关键质量属性优良的理想的CHO工程细胞株<sup>[75]</sup>。

相比于基因敲除技术,以RNAi作为基础的基因干扰技术和基因过表达技术具有更加高效、稳定、灵活的特点。目前,基因干扰以及基因过表达技术在CHO细胞糖基化改造、表达系统优化、抗凋亡以及提高产量的改造都发挥重要的作用。其中,基因干扰技术在改造时,保持了细胞内DNA序列的完整性,因此可塑性较好,具有很大的应用潜力。

重组蛋白质量方面的相关改造以糖基化改造为主,以增强ADCC、ADCP等效应,延长抗体半衰期,降低免疫原性等为改造目的。目前该方面的改造在产业化应用推广。值得注意的是,改善抗体糖型的同时可能会干预细胞生长,造成抗体产量降低。解决这种问题可通过细胞培养工艺参数的优化,达到产量与质量的兼顾<sup>[76]</sup>。

## 4 展望

通过对CHO细胞进行工程化改造,可以定向赋予细胞新的特性。研究者通过各种生物技术,结合细胞生长、代谢以及表达特性,对细胞进行定向改造。这些改造可赋予细胞抗凋亡、高水平表达以及优良的糖基化修饰等特性。这些工程改造技术的日趋成熟,将为细胞大规模表达提供产量与质量的保证,同时对药物的疗效及推广具有重要意义。

糖基化作为重组蛋白翻译后修饰最重要的一环,是抗体类药物在质量方面的一个关键问题。对其进行定向改造可以优化重组蛋白空间结构,提高蛋白类药物的生物活性与稳定性,降低免疫原性。其中,对FUT8的敲除,已应用于工业生产。对于其他糖型的糖基化改造仍处于研究阶段,有待进一步研究与推广。

细胞工程改造技术的日臻成熟,将极大提高对宿主细胞以及产物特性的定向改造,细胞的表达水平以及产物质量将大幅提高。其中,RNA干扰技术将被更加广泛的应用于细胞工程改造的各个方面,而准确的糖基化修饰也将持续被科研人员关注。

## 参考文献

- [1] Awwad S ,Angkawitwong U. Overview of antibody drug delivery [J]. *Pharmaceutics* ,2018 ,10 ( 3 ) : DOI: 10. 3390/pharmaceutics10030083.
- [2] Amann T ,Hansen A H ,Kol S ,et al. Glyco - engineered CHO cell lines producing alpha - 1 - antitrypsin and C1 esterase inhibitor with fully humanized N - glycosylation profiles [J]. *Metab Eng* , 2019 ,52: 143 - 152.
- [3] Kuo C C ,Chiang A W ,Shamie I ,et al. The emerging role of systems biology for engineering protein production in CHO cells [J]. *Curr Opin Biotechnol* 2018 ,51: 64 - 69.
- [4] 王登,刘煜. 用于重组蛋白表达的哺乳动物细胞系的研究进展 [J]. *药物生物技术* 2014 ,21(05): 478 - 482.
- [5] Shan Q ,Baltes N J ,Atkins P ,et al. ZFN ,TALEN and CRISPR - Cas9 mediated homology directed gene insertion in Arabidopsis: a disconnect between somatic and germinal cells [J]. *J Genet Genomics* 2018 ,45(12): 681 - 684.
- [6] Hirano S ,Nishimasu H ,Ishitani R ,et al. Structural basis for the altered PAM specificities of engineered CRISPR - Cas9 [J]. *Mol Cell* 2016 ,61(6): 886 - 894.
- [7] 刘娜,袁宝珠. 利用细胞工程技术改造蛋白生产用 CHO 细胞的研究进展 [J]. *中国医药生物技术* 2014 ,9(5): 369 - 371.
- [8] Fischer S ,Handrick R ,Otte K. The art of CHO cell engineering: A comprehensive retrospect and future perspectives [J]. *Biotechnol Adv* 2015 ,33(8): 1878 - 1896.
- [9] Coleman O ,Suda S ,Meiller J ,et al. Increased growth rate and productivity following stable depletion of miR - 7 in a mAb producing CHO cell line causes an increase in proteins associated with the Akt pathway and ribosome biogenesis [J]. *J Proteomics* ,2019 ,195: 23 - 32.
- [10] Kim J Y ,Kim Y G ,Lee G M. CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential [J]. *Appl Microbiol Biotechnol* 2012 ,93(3): 17 - 30.
- [11] 郑惠惠,江洪. CHO 细胞表达系统研究进展 [J]. *生物技术进展* 2016 ,6(4): 239 - 243.
- [12] 惠开元,高向东,徐晨. 单克隆抗体制备的细胞工程学研究进展 [J]. *中国生物工程杂志* 2012 ,32(2): 90 - 95.
- [13] Arden N ,Bettenbaugh M. J. Life and death in mammalian cell culture: strategies for apoptosis inhibition [J]. *Trends Biotechnol* , 2004 ,22(4): 74 - 80.
- [14] Zhang X ,Han L ,Zong H ,et al. Enhanced production of anti - PDI antibody in CHO cells through transient co - transfection with anti - apoptotic genes Bcl - x L and Mcl - 1 [J]. *Bioprocess Biosyst Eng* 2018 ,41(5): 633 - 640.
- [15] 张存超,寇庚,王皓. 基因工程改造与中国仓鼠卵巢细胞凋亡 [J]. *化学与生物工程* 2014 ,31(12): 1 - 3.
- [16] Baek E ,Noh S M ,Lee G M. Anti - Apoptosis engineering for improved protein production from CHO cells [J]. *Methods Mol Biol* , 2017 ,16(03): 71 - 85.
- [17] Han S ,Rhee W J. Inhibition of apoptosis using exosomes in Chinese hamster ovary cell culture [J]. *Biotechnol Bioeng* 2018 ,115(5): 1331 - 1339.
- [18] Chiang G G ,Sisk W P. Bcl - x(L) mediates increased production of humanized monoclonal antibodies in Chinese hamster ovary cells [J]. *Biotechnol Bioeng* 2005 ,91(7): 779 - 792.
- [19] Kim N S ,Lee G M. Overexpression of bcl - 2 inhibits sodium butyrate - induced apoptosis in Chinese hamster ovary cells resulting in enhanced humanized antibody production [J]. *Biotechnol Bioeng* 2000 ,71(3): 184 - 193.
- [20] Cost G J ,Freyvert Y ,Vafiadis A ,et al. BAK and BAX deletion using zinc - finger nucleases yields apoptosis - resistant CHO cells [J]. *Biotechnol Bioeng* 2010 ,105(2): 330 - 340.
- [21] Majors B S ,Bettenbaugh M J ,Pederson N E ,et al. Mcl - 1 overexpression leads to higher viabilities and increased production of humanized monoclonal antibody in Chinese hamster ovary cells [J]. *Biotechnol Prog* 2009 ,25(4): 1161 - 1168.
- [22] Meents H ,Enenkel B ,Eppenberger H M ,et al. Impact of coexpression and coamplification of sICAM and antiapoptosis determinants bcl - 2/bcl - x(L) on productivity ,cell survival and mitochondria number in CHO - DG44 grown in suspension and serum - free media [J]. *Biotechnol Bioeng* 2002 ,80(6): 706 - 716.
- [23] Tey B T ,Singh R P ,Piredda L ,et al. Influence of bcl - 2 on cell death during the cultivation of a Chinese hamster ovary cell line expressing a chimeric antibody [J]. *Biotechnol Bioeng* ,2000 ,68(1): 31 - 43.
- [24] Sung Y H ,Lee J S ,Park S H ,et al. Influence of co - down - regulation of caspase - 3 and caspase - 7 by siRNAs on sodium butyrate - induced apoptotic cell death of Chinese hamster ovary cells producing thrombopoietin [J]. *Metab Eng* 2007 ,9(5 - 6): 452 - 464.
- [25] Kim N S ,Lee G M. Inhibition of sodium butyrate - induced apoptosis in recombinant Chinese hamster ovary cells by constitutively expressing antisense RNA of caspase - 3 [J]. *Biotechnol Bioeng* , 2002 ,78(2): 217 - 228.
- [26] Yun C Y ,Liu S ,Lim S F ,et al. Specific inhibition of caspase - 8 and - 9 in CHO cells enhances cell viability in batch and fed - batch cultures [J]. *Metab Eng* 2007 ,9(5 - 6): 406 - 418.
- [27] Sauerwald T M ,Oyler G A ,Bettenbaugh M J. Study of caspase inhibitors for limiting death in mammalian cell culture [J]. *Biotechnol Bioeng* 2003 ,81(3): 329 - 340.
- [28] Figueroa B Jr. Ailor J E Osborne ,et al. Enhanced cell culture performance using inducible anti - apoptotic genes E1B - 19K and Aven in the production of a monoclonal antibody with Chinese hamster ovary cells [J]. *Biotechnol Bioeng* ,2007 ,97(4): 877 - 892.
- [29] Arden N ,Majors B S ,Ahn S H ,et al. Inhibiting the apoptosis pathway using MDM2 in mammalian cell cultures [J]. *Biotechnol Bioeng* 2007 ,97(3): 601 - 614.
- [30] Crea F ,Sarti D ,Falciani F ,et al. Over - expression of hTERT in CHO K1 results in decreased apoptosis and reduced serum dependency [J]. *J Biotechnol* 2006 ,121(2): 109 - 123.
- [31] Tabuchi H ,Sugiyama T ,Tanaka S ,et al. Overexpression of taurine transporter in Chinese hamster ovary cells can enhance cell viability and product yield ,while promoting glutamine consumption [J]. *Biotechnol Bioeng* 2010 ,107(6): 998 - 1003.
- [32] Jeon M K ,Yu D Y ,Lee G M. Combinatorial engineering of ldh - a and bcl - 2 for reducing lactate production and improving cell growth in dihydrofolate reductase - deficient Chinese hamster ovary cells [J]. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011 ,92(4): 779 - 790.
- [33] Kim Y G ,Lee G M. Bcl - xL overexpression does not enhance specific erythropoietin productivity of recombinant CHO cells grown at 33 degrees C and 37 degrees C [J]. *Biotechnol Prog* ,2009 ,25(1): 252 - 256.
- [34] Kim N S ,Lee G M. Response of recombinant Chinese hamster ovary cells to hyperosmotic pressure: effect of Bcl - 2 overexpression [J]. *J Biotechnol* 2002 ,95(3): 237 - 248.
- [35] Borner C. The Bcl - 2 protein family: sensors and checkpoints for life - or - death decisions [J]. *Mol Immunol* 2003 ,39(11): 615 - 647.
- [36] Templeton N ,Lewis A ,Dorai H ,et al. The impact of anti - apoptotic gene Bcl - 2 expression on CHO central metabolism [J]. *Metab Eng* 2014 ,25: 92 - 102.
- [37] Gulis G ,Simi K C ,de Toledo R R ,et al. Optimization of heterologous protein production in Chinese hamster ovary cells under overexpression of spliced form of human X - box binding protein [J]. *BMC Biotechnol* 2014 ,14: 26 ,1 - 12.
- [38] Kwon R J ,Kim S K ,Lee S I ,et al. Artificial transcription factors increase production of recombinant antibodies in Chinese hamster ovary cells [J]. *Biotechnol Lett* 2006 ,28(1): 9 - 15.
- [39] Grav L M ,Lee J S ,Gerling S ,et al. One - step generation of triple

- knockout CHO cell lines using CRISPR/Cas9 and fluorescent enrichment[J]. *Biotechnol J* 2015 ,10(9) : 1446 – 1456.
- [40] Pena – Blanco A ,Garcia – Saez A J ,Bax ,Bak and beyond – mitochondrial performance in apoptosis[J]. *FEBS J* 2018 ,285(3) : 416 – 431.
- [41] Iyer S ,Uren R T ,Kluck R M. Probing BAK and BAX activation and pore assembly with cytochrome C release ,limited proteolysis , and oxidant – induced linkage [J]. *Methods Mol Biol* ,2019 ,1877: 201 – 216.
- [42] Zhang E ,Lu X ,Yin S ,et al. The functional role of Bax/Bak in palmitate – induced lipooapoptosis[J]. *Food Chem Toxicol* ,2019 ,123: 268 – 274.
- [43] Ritter A ,Voedisch B ,Wienberg J ,et al. Deletion of a telomeric region on chromosome 8 correlates with higher productivity and stability of CHO cell lines [J]. *Biotechnol Bioeng* ,2016 ,113(5) : 1084 – 1093.
- [44] Rita Costa A ,Elisa Rodrigues M ,Henriques M ,et al. Guidelines to cell engineering for monoclonal antibody production [J]. *Eur J Pharm Biopharm* 2010 ,74(2) : 127 – 138.
- [45] Dreesen I A ,Fussenegger M. Ectopic expression of human mTOR increases viability ,robustness ,cell size ,proliferation ,and antibody production of chinese hamster ovary cells[J]. *Biotechnol Bioeng* ,2011 ,108(4) : 853 – 866.
- [46] Calmels C ,McCann A ,Malphettes L ,et al. Application of a curated genome – scale metabolic model of CHO DG44 to an industrial fed – batch process[J]. *Metab Eng* 2019 ,51: 9 – 19.
- [47] Zhang F ,Sun X ,Yi X ,et al. Metabolic characteristics of recombinant Chinese hamster ovary cells expressing glutamine synthetase in presence and absence of glutamine [J]. *Cytotechnology* 2006 ,51(1) : 21 – 28.
- [48] Park H ,Kim I H ,Kim I Y ,et al. Expression of carbamoyl phosphate synthetase I and ornithine transcarbamoylase genes in Chinese hamster ovary dhfr – cells decreases accumulation of ammonium ion in culture media [J]. *J Biotechnol* 2000 ,81(2 – 3) : 129 – 140.
- [49] Gupta S K ,Sharma A ,Kushwaha H ,et al. Over – expression of a codon optimized yeast cytosolic pyruvate carboxylase ( PYC2) in CHO Cells for an Augmented Lactate Metabolism [J]. *Front Pharmacol* 2017 ,8: 463.
- [50] Zhou M ,Crawford Y ,Ng D ,et al. Decreasing lactate level and increasing antibody production in Chinese Hamster Ovary cells ( CHO) by reducing the expression of lactate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase kinases [J]. *J Biotechnol* 2011 ,153(1 – 2) : 27 – 34.
- [51] Noh S M ,Park J H ,Lim M S ,et al. Reduction of ammonia and lactate through the coupling of glutamine synthetase selection and downregulation of lactate dehydrogenase – A in CHO cells [J]. *Appl Microbiol Biotechnol* 2017 ,101(3) : 1035 – 1045.
- [52] Toussaint C ,Henry O ,Durocher Y. Metabolic engineering of CHO cells to alter lactate metabolism during fed – batch cultures [J]. *J Biotechnol* 2016 ,217: 122 – 131.
- [53] Voronina E V ,Seregin Y A ,Litvinova N A ,et al. Design of a stable cell line producing a recombinant monoclonal anti – TNFalpha antibody based on a CHO cell line [J]. *Springerplus* 2016 ,5(1) : 1584 – 1595.
- [54] Sanders P G ,Hussein A ,Coggins L ,et al. Gene amplification: the Chinese hamster glutamine synthetase gene [J]. *Dev Biol Stand* ,1987 ,66: 55 – 63.
- [55] Fan L ,Kadura I ,Krebs L E ,et al. Improving the efficiency of CHO cell line generation using glutamine synthetase gene knock-out cells [J]. *Biotechnol Bioeng* 2012 ,109(4) : 1007 – 1015.
- [56] Gupta S K ,Shukla P. Gene editing for cell engineering: trends and applications [J]. *Crit Rev Biotechnol* ,2017 ,37(5) : 672 – 684.
- [57] Hong W W ,Wu S C. A novel RNA silencing vector to improve antigen expression and stability in Chinese hamster ovary cells [J]. *Vaccine* 2007 ,25(20) : 4103 – 4111.
- [58] Poulain A ,Perret S ,Malenfant F ,et al. Rapid protein production from stable CHO cell pools using plasmid vector and the cumate gene – switch [J]. *J Biotechnol* 2017 ,255: 16 – 27.
- [59] Davies S L ,O'Callaghan P M ,McLeod J ,et al. Impact of gene vector design on the control of recombinant monoclonal antibody production by Chinese hamster ovary cells [J]. *Biotechnol Prog* ,2011 ,27(6) : 1689 – 1699.
- [60] Dalton A C ,Barton W A. Over – expression of secreted proteins from mammalian cell lines [J]. *Protein Sci* ,2014 ,23(5) : 517 – 525.
- [61] Wang W ,Jia Y L ,Li Y C ,et al. Impact of different promoters ,promoter mutation ,and an enhancer on recombinant protein expression in CHO cells [J]. *Sci Rep* 2017 ,7(1) : 104 – 116.
- [62] Johari Y B ,Brown A J ,Alves C S ,et al. CHO genome mining for synthetic promoter design [J]. *J Biotechnol* 2019 ,294: 1 – 13.
- [63] Kawabe Y ,Inao T ,Komatsu S ,et al. Improved recombinant antibody production by CHO cells using a production enhancer DNA element with repeated transgene integration at a predetermined chromosomal site [J]. *J Biosci Bioeng* 2017 ,123(3) : 390 – 397.
- [64] Li Q ,Zhao C P ,Lin Y ,et al. Two human MARs effectively increase transgene expression in transfected CHO cells [J]. *J Cell Mol Med* 2019 ,23(2) : 1613 – 1616.
- [65] Bibila T A ,Flickinger M C. Use of a structured kinetic model of antibody synthesis and secretion for optimization of antibody production systems: II. Transient analysis [J]. *Biotechnol Bioeng* ,1992 ,39(3) : 262 – 272.
- [66] Kaneyoshi K ,Kuroda K ,Uchiyama K ,et al. Secretion analysis of intracellular "difficult – to – express" immunoglobulin G ( IgG) in Chinese hamster ovary ( CHO) cells [J]. *Cytotechnology* ,2019 ,71(1) : 305 – 316.
- [67] Borth N ,Mattanovich D ,Kunert R ,et al. Effect of increased expression of protein disulfide isomerase and heavy chain binding protein on antibody secretion in a recombinant CHO cell line [J]. *Biotechnol Prog* 2005 ,21(1) : 106 – 111.
- [68] Le Four V ,Girod P A ,Buceta M ,et al. CHO cell engineering to prevent polypeptide aggregation and improve therapeutic protein secretion [J]. *Metab Eng* 2014 ,21: 91 – 102.
- [69] Josse L ,Smales C M ,Tuite M F. Engineering the chaperone network of CHO cells for optimal recombinant protein production and authenticity [J]. *Methods Mol Biol* 2012 ,824: 595 – 608.
- [70] Costello A ,Lao NT ,Barron N ,et al. Improved yield of rhEPO in CHO cells with synthetic 5' UTR [J]. *Biotechnol Lett* ,2019 ,41(2) : 231 – 239.
- [71] Tan H K ,Lee MM ,Yap MG ,et al. Overexpression of cold – inducible RNA – binding protein increases interferon – gamma production in Chinese – hamster ovary cells [J]. *Biotechnol Appl Biochem* 2008 ,49( Pt 4) : 247 – 257.
- [72] Kaneyoshi K ,Yamano – Adachi N ,Koga Y ,et al. Analysis of the immunoglobulin G ( IgG) secretion efficiency in recombinant Chinese hamster ovary ( CHO) cells by using Citrine – fusion IgG [J]. *Cytotechnology* 2019 ,71(1) : 193 – 207.
- [73] Gomez N ,Ambhaikar M ,Zhang L ,et al. Analysis of Tubespins as a suitable scale – down model of bioreactors for high cell density CHO cell culture [J]. *Biotechnol Prog* 2017 ,33(2) : 490 – 499.
- [74] Costello A ,Coleman O ,Lao N T ,et al. Depletion of endogenous miRNA – 378 – 3p increases peak cell density of CHO DP12 cells and is correlated with elevated levels of ubiquitin carboxyl – terminal hydrolase 14 [J]. *J Biotechnol* 2018 ,288: 30 – 40.
- [75] Tan J G ,Lee Y Y ,Wang T ,et al. Heat shock protein 27 overexpression in CHO cells modulates apoptosis pathways and delays activation of caspases to improve recombinant monoclonal antibody titre in fed – batch bioreactors [J]. *Biotechnol J* ,2015 ,10(5) : 790 – 800.
- [76] Du Z ,Treiber D ,McCarter J D ,et al. Use of a small molecule cell cycle inhibitor to control cell growth and improve specific produc-



- tivity and product quality of recombinant proteins in CHO cell cultures [J]. *Biotechnol Bioeng* 2015 ,112( 1) : 141 – 155.
- [77] Raab N ,Mathias S ,Alt K ,et al. CRISPR/Cas9 – mediated knock-out of microRNA – 744 improves antibody titer of CHO production cell lines [J]. *Biotechnol J* , 2019 , 14 , DOI: 10. 1002/ biot. 201800477.
- [78] Ibarra N ,Watanabe S ,Bi J X ,et al. Modulation of cell cycle for enhancement of antibody productivity in perfusion culture of NSO cells [J]. *Biotechnol Prog* 2003 ,19( 1) : 224 – 228.
- [79] Steere N ,Wagner M ,Beishir S ,et al. Centrosome amplification in CHO and DT40 cells by inactivation of cyclin – dependent kinases [J]. *Cytoskeleton ( Hoboken)* 2011 ,68( 8) : 446 – 458.
- [80] Lee Y Y ,Wong K T ,Tan J ,et al. Overexpression of heat shock proteins ( HSPs) in CHO cells for extended culture viability and improved recombinant protein production [J]. *J Biotechnol* 2009 , 143( 1) : 34 – 43.
- [81] Yamano N ,Omasa T. EGCG improves recombinant protein productivity in Chinese hamster ovary cell cultures via cell proliferation control [J]. *Cytotechnology* 2018 ,70( 6) : 1697 – 1706.
- [82] Prabhu A ,Gadgil M. Nickel and cobalt affect galactosylation of recombinant IgG expressed in CHO cells [J]. *Biomaterials* 2019 ,32( 1) : 11 – 19.
- [83] Wada R ,Matsui M ,Kawasaki N. Influence of N – glycosylation on effector functions and thermal stability of glycoengineered IgG1 monoclonal antibody with homogeneous glycoforms [J]. *MABs* , 2019 ,11( 2) : 350 – 372.
- [84] Cadena A P ,Cushman T R ,Welsh J W. Glycosylation and antitumor immunity [J]. *Int Rev Cell Mol Biol* 2019 ,343: 111 – 127.
- [85] Wong A W ,Baginski T K ,Reilly D. E. Enhancement of DNA uptake in FUT8 – deleted CHO cells for transient production of afucosylated antibodies [J]. *Biotechnol Bioeng* 2010 ,106( 5) : 751 – 763.
- [86] Louie S ,Haley B ,Marshall B ,et al. FX knockout CHO hosts can express desired ratios of fucosylated or afucosylated antibodies with high titers and comparable product quality [J]. *Biotechnol Bioeng* 2017 ,114( 3) : 632 – 644.
- [87] Chung S ,Quarmby V ,Gao X ,et al. Quantitative evaluation of fucose reducing effects in a humanized antibody on Fcγ receptor binding and antibody – dependent cell – mediated cytotoxicity activities [J]. *MABs* 2012 ,4( 3) : 326 – 340.
- [88] Lin N ,Mascarenhas J ,Sealover N R ,et al. Chinese hamster ovary ( CHO) host cell engineering to increase sialylation of recombinant therapeutic proteins by modulating sialyltransferase expression [J]. *Biotechnol Prog* 2015 ,31( 2) : 334 – 346.
- [89] Wong N S ,Yap M G ,Wang D I. Enhancing recombinant glycoprotein sialylation through CMP – sialic acid transporter over expression in Chinese hamster ovary cells [J]. *Biotechnol Bioeng* 2006 , 93( 5) : 1005 – 1016.
- [90] Zhang L ,Castan A ,Stevenson J ,et al. Combined effects of glycosylation precursors and lactate on the glycoprofile of IgG produced by CHO cells [J]. *J Biotechnol* 2019 ,289: 71 – 79.
- [91] Lee J S ,Grav L M ,Lewis N E ,et al. CRISPR/Cas9 – mediated genome engineering of CHO cell factories: Application and perspectives [J]. *Biotechnol J* 2015 ,10( 7) : 979 – 994.
- [92] Kotidis P ,Jedrzejewski P ,Sou S N ,et al. Model – based optimization of antibody galactosylation in CHO cell culture [J]. *Biotechnol Bioeng* 2019 ,116: 1612 – 1626.

### ( 上接第 293 页)

- [40] Li J ,Meng X ,Zong Y ,et al. Gene replacements and insertions in rice by intron targeting using CRISPR – Cas9 [J]. *Nat Plants* , 2016 ,2( 10) : 30 – 39.
- [41] Yu Q ,Jalaludin A ,Han H ,et al. Evolution of a double amino acid substitution in the 5 – enolpyruvylshikimate – 3 – phosphate synthase in eleusine indica conferring high – level glyphosate resistance [J]. *Plant Physiology* 2015 ,167( 4) : 1440 – 1449.
- [42] Hummel A W ,Chauhan R D ,Cermak T ,et al. Allele exchange at the *EPSPS* locus confers glyphosate tolerance in cassava [J]. *Plant Biotechnology Journal* 2018 ,16( 7) : 1275 – 1282.
- [43] Heigwer F ,Kerr G ,Boutros M. E – CRISP: Fast CRISPR target site identification [J]. *Nat Methods* 2014 ,11( 2) : 122 – 134.
- [44] 黄娟 ,邓国富 ,高利军 等. CRISPR/Cas9 系统及其在作物育种中的应用 [J]. *南方农业学报* 2018 ,5( 1) : 18 – 26.
- [45] C. M. Lee ,T. J. Cradick ,E. J. Fine ,et al. Nuclease target site selection for maximizing on – target activity and minimizing off – target effects in genome editing [J]. *Mol. Ther* ,2016 ,35( 9) : 475 – 487.
- [46] T. G. Montague J. M. Cruz J. A. Gagnon ,et al. CRISPR/Cas9 and TALEN web tool for genome editing [J]. *Nucleic Acids Res* 2014 , 42( 5) : 401 – 407.
- [47] A. Rastogi ,O. Murik ,C. Bowler ,et al. PhytoCRISP – Ex: a web – based and stand – alone application to find specific target sequences for CRISPR/Cas editing [J]. *BMC Bioinformatics* 2016 , 17( 1) : 261 – 268.
- [48] K. Xie J. Zhang ,Y. Yang ,et al. Genome – wide prediction of highly specific guide RNA spacers for CRISPR – Cas9 mediated genome editing in model plants and major crops [J]. *Mol. Plant* , 2014 ,53( 7) : 923 – 926.
- [49] Lei Y ,Lu L ,Liu HY ,. CRISPR – P: A web tool for synthetic single – guide RNA design of CRISPR – system in plants [J]. *Mol Plant* , 2014 ,7( 9) : 1494 – 1496.
- [50] Y. Fu J. D. Sander ,D. Reyon ,et al. Joung ,Improving CRISPR – Cas9 nuclease specificity using truncated guide RNAs [J]. *Nat. Biotechnol* 2014 ,32( 6) : 279 – 284.
- [51] S. Hara M. Tamano S. Yamashita ,et al. Generation of mutant mice via the CRISPR/Cas9 system using FokI – dCas9 [J]. *Sci. Rep* , 2015 ,5( 1) : 11 – 17.
- [52] S. Q. Tsai ,N. Wyvekens ,C. Khayter ,et al. Dimeric CRISPR RNA – guided *FokI* nucleases for highly specific genome editing [J]. *Nat. Biotechnol* 2014 ,32( 3) : 569 – 576.
- [53] Y. Dang ,G. Jia J. Choi ,H. Ma ,et al. Optimizing sgRNA structure to improve CRISPR – Cas9 knockout efficiency [J]. *Genome Biol*. 2015 ,32( 16) : 280 – 287.
- [54] I. M. Slaymaker ,L. Gao ,B. Zetsche ,et al. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science* 2016 ,351( 8) : 84 – 88.

### ( 上接第 298 页)

- [47] Jiang H ,Franz C J ,Wu G ,et al. Orsay virus utilizes ribosomal frameshifting to express a novel protein that is incorporated into virions [J]. *Virology* 2014 ,450 – 451: 213 – 221.
- [48] Ashe A ,Sarkies P ,Jérémie Le Pen ,et al. Antiviral RNAi against orsay virus is neither systemic nor transgenerational in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Journal of Virology* ,2015 ,89( 23) : 12035 – 12046.
- [49] Ashe A ,Tony BÉlicard ,Jérémie Le Pen ,et al. A deletion polymorphism in the *Caenorhabditis elegans* RIG – I homolog disables viral RNA dicing and antiviral immunity [J]. *Elife* , 2013 , 2( 2) : e00994.
- [50] Sterken M G ,Snoek L B ,Bosman K J ,et al. A Heritable antiviral RNAi response limits orsay virus infection in *Caenorhabditis elegans* N2 [J]. *PLOS ONE* 2014 ,9( 2) : e89760.
- [51] Jiang H ,Chen K ,Sandoval L E ,et al. An evolutionarily conserved pathway essential for orsay virus infection of *Caenorhabditis elegans* [J]. *mBio* 2017 ,8( 5) : e00940 – 17.